第28卷 第3期　昆　虫　学　报　Vol. 28, No. 3
1985年8月　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　Aug., 1985

非洲钝缘蜱感染Q热立克次体敏感度的测定

刘连珠　况明书　刘丽娟　向信礼*　张邦燮*
(第三军医大学寄生虫学教研室)

摘要　Q热立克次体以 10^{-1}—10^{-12} 不同稀释度,用血腔注射法感染非洲钝缘蜱,感染35天,取蜱血淋巴液,分别用 Gimenez 染色法及免疫荧光技术检查,在 10^{-1}—10^{-5} 的稀释度,两种方法检出率基本相似。10^{-6} 以下各组,免疫荧光尚可检出少数阳性标本,而 Gimenez 法则无阳性,前者总阳性率为 48.28%,后者为 40.68%。感染的蜱悬液接种豚鼠,12组动物血清做Q热补体结合试验全部阳性。动物发病情况如潜伏期长短、发烧天数等似与蜱内立克次体的含量有关。

关键词　非洲钝缘蜱　Q热立克次体　血淋巴

非洲钝缘蜱 *Ornithodoros moubata* 是非洲地区的一种常见软蜱,根据其嗜血习性至少包括4个近似种,它是蜱传回归热的重要媒介 (Servie, 1980)。Davis 早在1943年就证明非洲钝缘蜱可实验感染Q热立克次体,1951年 Jadin 在刚果从自然界捕捉的非洲钝缘蜱中分离出Q热立克次体 (Berge 和 Edwin, 1953)。1979年作者等提出非洲钝缘蜱吸血习性广泛;耐饥力和繁殖力强;饲养管理方便;对Q热立克次体较为敏感,且能长期储存病原体 (刘连珠等, 1979)。本文再次以非洲钝缘蜱用不同的稀释度Q热立克次体进行感染,并对其敏感性作进一步观察。

材 料 与 方 法

非洲钝缘蜱　本种在我室长期饲养保存已达30余年,开始保存于室温,1980年后饲养于温度25℃±1,相对湿度70—80%的恒温室中,本次试验均为同一龄期稚虫。

Q热立克次体 *Coxiella burneti*　系 Henzerling 株,小白鼠2代转鸡胚卵黄囊3代,镜检立克次体数量为++—+++,以此鸡胚卵黄囊用 Hank's 液配成10%的悬液,并依次稀释为 10^{-2}、10^{-3}…10^{-12} 等12个不同的稀释度备用。

感染方法　血腔注射法,将备用的蜱分成12个组,每组10只,先以无菌生理盐水反复冲洗蜱体表面,使用10微升的微量注射器自蜱体第3对足后侧缘徐徐注入含不同稀释度立克次体的卵黄囊悬液,每只蜱注射量为10微升,注射后停针1—2分钟再退出空针,否则注射物易外溢。

血淋巴试验　血腔注射感染35天,每组取蜱5只,分别剪去前足末端,血淋巴液自动从断肢处溢出,每只蜱同时涂片2张,分别做 Gimenez 染色及免疫荧光抗体检查。

本文于1983年2月收到。
* 微生物学教研室。

免疫荧光间接法检查　Q热立克次体免疫血清及荧光抗体标记血清的制备，均按本室常规方法进行。荧光显微镜为日本 Olympus 落射光 AH、RFL 型，配用 BG_{12} OG_{515} 滤光片，光源为超高压汞灯 200 瓦，特异性荧光亮度的判定按+—+++制，以“++”以上亮度并具有Q热立克次体形态学特征者判定为阳性反应。

实验动物　本校动物室繁殖的健康豚鼠，每只体重在250—400 克之间，使用前抽心血做Q热补体结合试验正常者。取感染的蜱，每组 5 只(少数 4 只)，按本室常规处理后腹腔接种豚鼠 2 只。动物接种前 2—3 天，接种后 21 天，每日上午自肛门测体温一次，40℃以上者为发烧反应。恢复期血清按本室常规方法做Q热补体结合试验。

结　　果

一、非洲钝缘蜱感染后血淋巴液检查

非洲钝缘蜱以血腔注射法感染Q热立克次体，感染后第 35 天用 Gimenez 染色法及荧光抗体技术进行检查，结果如表 1。

表 1　非洲钝缘蜱血淋巴试验立克次体检查结果

Table 1　Results of detection of *Coxiella burneti* in the haemolymph of *Ornithodoros moubata* inoculated with different dilutions of infected chick yolk sacs.

感染卵黄囊立克次体稀释度	Gimenez 染色法		免疫荧光检查	
	阳性数/检查蜱数	立克次体数量*	阳性数/检查蜱数	立克次体数量*
10^{-1}	5/5	++—++++	5/5	++++—+
10^{-2}	5/5	++—++++	5/5	+++—++
10^{-3}	5/5	+—+++	5/5	++++—++
10^{-4}	4/5	+—+++	5/5	+++—++
10^{-5}	4/5	+—++	4/5	+—++
10^{-6}	1/5	+	1/5	+
10^{-7}	0/5	—	1/5	+
10^{-8}	0/5	—	1/4	+
10^{-9}	0/5	—	0/5	—
10^{-10}	0/5	—	1/4	+
10^{-11}	0/4	—	0/5	—
10^{-12}	0/5	—	0/5	—

* +每视野立克次体 10 个以下；　++ 为 10—100 个；
+++ 为 101—1,000 个；　++++ 为 1,000 以上。

用两种方法检查的蜱类标本中(表 2)，Gimenez 染色法实际检查 59 只，阳性 24 只，阳性率为 40.68%，免疫荧光法实际查 58 只，阳性 28 只，阳性率为 48.28%。其中以两种方法同时检查的蜱类标本共 57 只，Gimenez 染色法及免疫荧光检查两者均阳性者 22 只，占 38.59%；两者同时阴性者 27 只，占 47.36%，故二者的总符合率为 85.96%。Gimenez 染色阳性免疫荧光阴性者 2 只；Gimenez 染色阴性而免疫荧光阳性者 6 只。若以 57 只标本两种检查技术累计阳性率比较，前者为 42.11% (24/57)，后者为 49.12% (28/57)。故免疫荧光技术检查，似略优于 Gimenez 染色法。

二、非洲钝缘蜱感染后接种豚鼠反应

表 2 非洲钝缘蜱感染立克次体后血淋巴液两种检查方法比较

Table 2 Comparison of the two techniques of defection of *Coxiella burneti* in the haemolymph of *Ornithodoros moubata*.

方 法	阳性数/检查蜱数 (%)	符 合 情 况			
		*G+/IF+	G+/IF-	G-/IF+	G-/IF-
Gimenez 染色法 免疫荧光检查	24/59(40.68) 28/58(48.28)	22	2	6	27

* G = Gimenez 染色法 IF = 免疫荧光技术

表 3 非洲钝缘蜱血腔注射感染不同剂量立克次体后豚鼠反应情况

Table 3 Reaction of the guinea pigs after the injection of suspensions of *Ornithodoros moubata* inoculated with different dilutions of infected chick yolk sacs.

感染剂量组	潜伏期	发烧天数	温度范围(℃)	Q热补体结合试验结果
10^{-1}	1; 1	6; 3	40—40.5; 40.2—41	>1:512; >1:1024
10^{-2}	1; 1	*1; 8	40 40.5—40.8	△ >1:1024
10^{-3}	1; 1	*1; 3	40.1; 40.2—40.9	△ 1:512
10^{-4}	6; 2	1; 6	40; 40—40.7	>1:1024; 1:1024
10^{-5}	3; 1	4; 6	40—40.3; 40—40.6	1:512; >1:1024
10^{-6}	2; 2	5; 6	39.8—40.3; 39.9—40.9	1:256; >1:1024
10^{-7}	第三天死亡 5	… 2	… 40.2—40.7	△ 1:256
10^{-8}	第三天死亡 6	… 1	… 40	△ 1:64
10^{-9}	第二天死亡 0	… 0	… 39.5	△ >1:1024
10^{-10}	6; 3	1; 4	40.1; 40.2—40.6	1:512; >1:1024
10^{-11}	0 3	0; 5	39; 40.2—41	1:32; 1:512
10^{-12}	6; 4	1; 4	40; 40.2—41	1:64; 1:512

* 发烧期死亡 … 无结果 △ 动物死亡未测

12 个不同稀释度立克次体卵黄囊悬液，用血腔注射法感染非洲钝缘蜱，在感染后 48 天，每组取 4—5 只蜱，腹腔接种豚鼠 2 只，观察动物发病情况，如潜伏期、发烧反应及其持续天数，接种后 26 天在动物恢复期采心血做Q热补体结合试验，实验过程中，5 只动物死亡，各组动物的反应情况如表 3。

讨 论

非洲钝缘蜱对Q热立克次体是一种较敏感的节肢动物，感染Q热立克次体的动物在发烧期间，以之吸血感染很易获得成功(刘连珠等，1979)。作者等未发表的资料中对非洲钝缘蜱感染Q热立克次体后，用免疫荧光技术检查其阳性率为 92.5%。俞树荣等采用血腔注射法感染Q热立克次体 YS-8 株，3 天后用 Gimenez 染色法及免疫荧光法在血淋巴中能明确查见立克次体，而 Henzerling 株则在 7 天始能查到，喂血感染法 10、14 天的检查仍为阴性 (俞树荣等，1979)。这似乎说明：(1) 非洲钝缘蜱对Q热立克次体的不同株感染有所不一致；(2) 血腔注射法能较早地在血淋巴液中查出立克次体。但上述材料均为 10^{-1} 的立克次体浓度。本实验采用不同的稀释度的病原体含量用血腔注射法感染非

洲钝缘蜱，用 Gimenez 染色法及免疫荧光技术检查同一份标本，借以测定非洲钝缘蜱对Q热立克次体的敏感性及两种检查方法效果的比较。实验结果表明：以血腔注射法感染非洲钝缘蜱，在 10^{-1}—10^{-5} 浓度范围内，无论 Gimenez 染色法或免疫荧光检查法均可成功地查见立克次体，病原体寄生于血细胞内，数量多，形态典型。蜱的血淋巴检查，确为一种简便、快速而可靠的检查方法(Rehacek 等，1971)，而非洲钝缘蜱感染Q热立克次体，确为一种敏感的节肢动物，在实验室用以保存病原体甚为理想。

Zupancicova Majerska 等 (1972) 曾报告他们在捷克斯洛伐克采得的边缘革蜱 *Dermacentor marginatus* 雌蜱，喂以健康豚鼠，5—6 天后用 Gimenez 染色法及免疫荧光法检查落基山斑点热立克次体，并对 14 只蜱的血淋巴液、胃、马氏管、唾液腺、神经节、卵巢等各组织进行检查，认为 Gimenez 染色法查得的立克次体数量似乎优于免疫荧光技术，特别是在卵巢涂片中所见立克次体数量较多。俞树荣等 (1979) 在血腔注射感染的 23 只非洲钝缘蜱的检查中，Gimenez 染色及免疫荧光检查两者均为阳性者 19 只，Gimenez 法阳性免疫荧光阴性者 3 只，而免疫荧光阳性 Gimenez 法阴性者无，因而认为 Gimenez 法阳性率高于免疫荧光检查法。我们本次的实验结果显示：Gimenez 染色法和免疫荧光检查法在 10^{-1}—10^{-6} 各组中，除前者在检查时立克次体数量较多，且多为细胞内成团寄生，因而便于检获，其他在阳性率方面似无明显不同。10^{-6} 以下各组，免疫荧光法还可查出少数阳性标本。而 Gimenez 染色法则无此现象，且免疫荧光检查的 58 份标本中总阳性率为 48.28%，而 59 份 Gimenez 染色检查的标本中为 40.68% 的阳性率，故我们认为免疫荧光检查似优于 Gimenez 染色法，特别表现在轻度感染的蜱类标本中是如此。

当蜱吸食含有Q热立克次体的血液，可以很快繁殖。Smith (1940) 就曾指出肩角血蜱 *Haemaphysalis humerosa* 的肠上皮细胞是立克次体的繁殖场所，其肠腔亦含有很多立克次体，蜱同蜱的粪便在多数情况下，自然集中了贝氏立克次体。安氏革蜱 *Dermacentor andersoni* 的成虫 $10^{-11.7}$ 的浓度，稚虫 10^{-8}—10^{-12} 的浓度，可使豚鼠感染，而安氏革蜱的粪便，10^{-8} 的浓度，亦可使动物感染 (Derrick, 1953)。足见敏感的蜱类，感染Q热立克次体后，其组织内病原体的含量是很高的。我们的实验结果表明：注射不同浓度的Q热立克次体于非洲钝缘蜱内，于感染后 48 天的蜱悬液接种豚鼠，从动物发病情况及Q热补体结合试验，均证明 10^{-1}—10^{-12} 各组动物都获得感染。10^{-1}—10^{-3} 各组动物潜伏期平均仅为 1 天；10^{-4}—10^{-6} 各组平均为 2.6 天；10^{-7}—10^{-12} 各组其潜伏期则延长为 4.6 天。说明注射前立克次体浓度大，其发病快，潜伏期短，反之亦然。而动物发烧的情况则相反，即注射前立克次体浓度大，病情重，发烧时间长，如 10^{-1}—10^{-3} 发烧平均天数为 5 天；10^{-4}—10^{-6} 为 4.6 天；10^{-7}—10^{-12} 平均发烧天数缩短为 2 天。动物潜伏期和发烧期的长短和蜱体内立克次体的含量是相适应的。

参　考　文　献

刘连珠等　1979　非洲钝缘蜱对Q热立克次体实验感染的研究。流行病学杂志 1979 (3)：199—203。

俞树荣等　1979　蜱血淋巴试验检查立克次体初步研究。流行病学杂志 1979 (3)：195—8。

Berge, T. O. and Edwin 1953 World Distribution of Q Fever: Human, Animal and Arthropod Infection. *Am. J. Hyg* **57**(2): 125—43.

Davis, G. E. 1943 American Q Fever: Experimental transmission by the Argasid ticks *Ornithodoros*

moubata and *O. hermsi* Pub. *Health Reports* **58:** 984—7.
Derrick, E. H. 1953 The Epidemiology of Q Fever: A Review. The *Med. Jr. Australia* **1**(8): 245—53.
Rehacek, J. et al., 1971 Haemocyte test—An easy quick and reliable method for the detection of Rickettsiae in ticks. *Acta Virol.* **15**(3): 237—40.
Service, M. W. 1980 A Guide to Medical Entomology. Macmillian International College Editions (MICE). Hong Kong.
Zupancicova-Maierska M. et al. 1972 Localization of *Coxiella burneti* and rickettsiae of Rocky-Mountain spotted fever group in ticks. *Acta Virol.* 16(1): 63—70.

THE SUSCEPTIBILITY OF *ORNITHODOROS MOUBATA* TO THE MICROORGANISM *COXIELLA BURNETI*

LIU LIAN-ZHU KUANG MING-SHU LIU LI-JUAN XIANG XIN-LI ZHANG BANG-XIE
(Department of Parasitology and Microbiology, Third Military Medical College)

Ornithodoros moubata were expermentally infected with *Coxiella burneti* through the haemocoel. The dilutions of the infected chick yolk sacs were prepared in series of 10-fold from 10^{-1}—10^{-12}. Each of these dilutions was inoculated into each group of 5 ticks. The haemolymph samples from these ticks were taken on the 35th day after inoculation. In the haematocyte test, the microorganisms in the body were examined both with Gimenez stain and immunofluorescence technique.

The results of the experiments showed that in large-doses such as 10^{-1}—10^{-5}, the microorganisms in the haemolymph samples were found similar by these two techniques. However, in lower-doses as 10^{-7}, 10^{-8} and 10^{-10}, they were positive by immunofluorescence technique, but negative by Gimenez stain.

The positive percentage in haematocyte test with Gimenez stain was 40.68% and by immunofluorescence technique was 48.28%. Therefore, the immunofluorescence technique is more sensitive than the Gimenez stain in the detection of *C. burneti* in haematocyte test.

12 groups of guinea pigs were inoculated with the dilutions of the suspension of infected ticks for 48 days, the blood samples for complement-fixation test were taken by cardiac puncture on the 26th day after inoculation. All of the guinea pigs inoculated were complement-fixation test positive, but the incubation period and the duration of fever among these guinea pigs suffered from *C. burneti* infections varied in these groups of different dilutions: The length of incubation period was 1 day (on average) in groups of dilutions of 10^{-1}—10^{-3}; 2.6 days (on average) in dilutions of 10^{-4}—10^{-6}, and extended to 4.6 days (on average) in dilutions of 10^{-7}—10^{-12}. The duration of fever were for 5 days (on average) in groups of dilutions of 10^{-1}—10^{-3}; 4.6 days (on average) in dilutions of 10^{-4}—10^{-6}, and shorten to two days (on average) in the other dilutions of 10^{-7}—10^{-12}.

It is suggested that the incubation period and durations of fever among the infected guinea pigs are in corrlation with the amount of *C. burneti* in the body of the infected *O. moubata*.

Key words *Ornithodoros moubata*——*Coxiella burneti*——haemolymph